

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 40 05 152 A 1

⑤ Int. Cl. 5:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/82
C 12 N 5/10
A 01 H 4/00

⑪ Aktenzeichen: P 40 05 152.8
⑭ Anmeldetag: 17. 2. 90
⑬ Offenlegungstag: 22. 8. 91

DE 40 05 152 A 1

⑦ Anmelder:
Kahl, Günter, Prof. Dr., 6453 Seligenstadt, DE

⑧ Erfinder:
Hofmann, Dieter Siegfried, 6238 Hofheim, DE; Kahl,
Günter, Prof. Dr., 6453 Seligenstadt, DE

⑤4 Verbesserung der Transformation von Pflanzenzellen

⑤7 Die Transformation von Protoplasten aus Pflanzenzellen mit Fremd-DNA und deren Expression erfolgt sehr effektiv, wenn diese DNA in Form eines Komplexes mit Histonen eingesetzt wird.

DE 40 05 152 A 1

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines DNA-Histon-Komplexes zur Transformation von Pflanzenzellen-Protoplasten. Weitere Aspekte der Erfindung werden im folgenden erläutert und in den Patentansprüchen definiert.

Wienhues et al., DNA 6 (1987) 81 – 89 haben erkannt, daß die Übertragung "nackter" DNA in eukaryotische Zellen unter unnatürlichen Bedingungen erfolgt, weshalb sie es für wünschenswert erklärten, die DNA in natürlicherer Konformation, möglicherweise als DNA-Protein-Komplex, zu übertragen. Sie benützten deshalb einen Komplex aus Adeno-Virus 2-Protein VII, einem stark basischen viralen Protein, oder Protamin und Adeno-Virus-DNA, um damit humane, Hamster- oder Insektenzellen zu transfizieren.

Böttger et al., Biochimica et Biophysica Acta 950 (1988) 221 – 228 beschäftigten sich mit der Verpackung von Vektoren in natürliche Chromatin-Bestandteile. Sie erzeugten hierzu einen Komplex aus dem chromosomalen Nicht-Histon HMG1 und Vektor-DNA. Dieser Komplex kann in Säugerzellen unter physiologischen Bedingungen eingebracht werden. Die Transfektionsraten werden als gleich oder sogar höher als mit der Calciumphosphat-Coprecipitationsmethode angegeben. Es wurde weiterhin ein Schutz der DNA im Komplex vor dem Angriff durch Endonucleasen festgestellt.

Kaneda et al., Science 243 (1989) 375 – 378 brachten Vesikel-Komplexe aus DNA und dem Kern-Protein HMG1 in Ratten-Leberzellen ein. Sie spekulierten, daß der Komplex beständiger gegen Nukleasen sei oder Konformationseigenschaften habe, die einen leichteren Durchgang durch die Kernporen erlaubten als für DNA.

Scherneck et al., Acta virol. 27 (1983) 1 – 11 studierten den Einfluß von Nukleoprotein-Komplexen auf die Transfektion von Hamsterzellen mit SV40-DNA. Hierbei stellten sie fest, daß die Transformationsfähigkeit der viralen DNA nicht gesteigert werden konnte, wenn sie mit den vier nukleosomalen Histonen assoziiert wurde (Kontrolle: proteinfreie SV40-DNA).

Entsprechende Transformationsexperimente mit Pflanzenzellen wurden bisher nicht beschrieben. Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Protoplasten von Pflanzenzellen sehr effektiv mit DNA-Histon-Komplexen transformiert werden können. Im Vergleich zu anderen Methoden des direkten Gentransfers wird nicht nur die Transformationsrate drastisch und reproduzierbar erhöht, sondern es werden auch in den Transformanten mehr intakte Kopien des eingebrachten Fremdgens gefunden. Es ist somit möglich und gewährleistet, daß das Fremdgen unter der Kontrolle eines mit-eingebrachten effektiven Promotors exprimiert wird. Hierdurch und durch die vermehrte Anzahl an funktionsfähigen Genkopien kann eine hohe Expressionsrate erzielt werden.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Expression von Fremdgenen in Pflanzenzellen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Protoplasten mit DNA-Konstruktionen, die Histone gebunden enthalten, transformiert. Es ist bekannt, daß Histone im allgemeinen sehr hochkonservierte Proteine sind und daß Histon H3 und H4 aus Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen wie Hefe einen hohen Grad an Homologie aufweisen. Es wurde bereits eine ganze Reihe von Histogenen kloniert, so daß diese Produkte leicht zugänglich sind.

Aus Hofmann et al., FEBS Letters 256 (1989) 123 – 127 ist es bekannt, daß die Rekonstitution von

Nukleosomen aus klonierter DNA und tierischen Histonen unproblematisch ist. Hierfür wurden entweder Zellextrakte oder gereinigte Histone eingesetzt. Die Isolierung funktionsfähiger pflanzlicher Histone gelingt durch Salzextraktion in Gegenwart von Harnstoff.

Für die Herstellung transgener Nutzpflanzen ist es natürlich wünschenswert, daß – außer dem gewünschten zu exprimierenden – kein fremdes Protein in die Zelle eingebracht wird. Lediglich aus diesem Gesichtspunkt, nicht aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit werden pflanzliche Histone für die Komplexbildung bevorzugt.

Aus Hofmann et al., a. a. O., ist es bekannt, daß auch Komplexe, die keine nukleosomale Organisation aufweisen, DNA innerhalb dieser Komplexe gegen Nukleasen stabilisieren. Wie bereits erwähnt, vermuteten Kaneda et al., a. a. O., daß der Angriff von Nukleasen einen Einfluß auf die Transformationsrate haben könne.

Im Hinblick auf diese Befunde ist es also nicht erforderlich, daß die zur Transformation eingesetzten Komplexe eine strenge nukleosomale Organisation aufweisen. Bevorzugt sind jedoch Komplexe, bei denen zumindest im wesentlichen eine derartige Organisation vorliegt. Ein leistungsfähiges Verfahren zur Herstellung solcher Komplexe ist bei Hofmann et al. beschrieben.

Im Prinzip kann die erfindungsgemäße Transformation mit Komplexen aus Vektor-DNA und Histonen durchgeführt werden. Bevorzugt wird ein direkter Gentransfer mit den üblichen Methoden. Besonders bewährt hat sich der direkte Gentransfer mittels Elektroporation (Weising et al., Annu. Rev. Genet. 22 (1988) 421 – 477), mit der schon über 50 Pflanzenarten stabil transformiert werden konnten.

Die Erfindung betrifft weiterhin Kalli, die aus den erfindungsgemäß erzeugten Transformanten gewonnen werden, aus solchen Kalli regenerierte Pflanzen sowie auf Vermehrungsgut, das aus einem solchen Kallus oder aus einer regenerierten Pflanze gewonnen wurde.

Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiele

1. Verwendetes Plasmid

Für alle Transformationsexperimente wurde das Plasmid pLGV 1103 neo (Czernilovsky et al., DNA 5 (1986) 101 – 113) eingesetzt. Dieses Plasmid enthält die Sequenz des Transposons Tn 5, das für die Neomycinphosphotransferase II (NPT-II) codiert, deren Gen unter der Kontrolle des konstitutiven Nopalinsynthetase (NOS)-Promotors steht und am 3'-Ende mit der entsprechenden Octopinsynthetase-Terminatorsequenz gekoppelt ist. Zusätzlich enthält das Plasmid noch das Transposon Tn 903, das prokaryotische Kanamycinresistenz vermittelt. Das Gen für Kanamycin-Resistenz kodiert ein Protein, das Neomycin und Kanamycin phosphoryliert und damit inaktiviert. Es kann somit als selektierbarer Marker für Organismen eingesetzt werden, die nicht schon von Natur aus tolerant gegen Kanamycin sind. Für alle Transformationsversuche wurde pLGV 1103 neo an der EcoRI-Schnittstelle des pBR322 linearisiert und frei oder als Histonkomplex (Hofmann et al., a. a. O.) eingesetzt.

2. Isolation und Reinigung von Protoplasten

Protoplasten wurden aus jungen Blättern steril ange-

zogener Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana SR-1) isoliert. Vorversuche ergaben, daß die höchste Protoplastenausbeute aus der Sorte SR 1 gewonnen werden konnte, welche dann in allen Versuchen eingesetzt wurde. Der osmotische Wert aller Lösungen wurde mit einem Osmometer kryoskopisch ermittelt und durch Zugabe von destilliertem Wasser oder kristallinem Mannit eingestellt. Für die Isolation von Protoplasten aus Blättern von *Nicotiana tabacum* erwies sich ein Wert von 700 mosmol als ideal. Daher wurden alle eingesetzten Lösungen auf einen Wert von 700 mosmol \pm 3% eingestellt.

In eine Rollflasche (ca. 2 l) wurden 40 ml Gamborg B-5-Medium (Gamborg et al., Exp. Cell Res. 506 (1968) 148 – 151) sowie 10 ml Enzymlösung I gegeben.

Enzymlösung I:

1,0% Cellulase R 10
0,2% Macerozym R 10 (technische Pektinase)
4,3% Mannit
5 – 6 junge Tabakblätter wurden in einer Petrischale mit 0,3 M Mannit benetzt und in etwa 2 x 2 mm große Stücke geschnitten. Nach dem Absaugen überschüssiger Flüssigkeit wurden die Blattfragmente in die Rollflasche gegeben und 15 – 20 Stunden lang bei Raumtemperatur mit 5 – 10 rpm inkubiert. Die Vollständigkeit der Verdauung wurde unter dem Mikroskop geprüft. Die Protoplasten müssen kugelförmig sein. Zur Abtrennung von Sklerenchymresten, Leitbündeln usw. wurde durch ein Nylonnetz mit 80 µm Maschenweite gesiebt und mit Lösung W 5 (Menczel et al., Theor. Appl. Genet. 59 (1981) 191 – 195) auf 75 ml aufgefüllt.

Lösung W 5:

154 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
5 mM Glucose (pH 5,7).

Im Ausschwingrotor wurde 3 Minuten lang bei 1000 rpm ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Pellets wurden sehr vorsichtig in W5 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets in einer Saccharoselösung resuspendiert.

Saccharoselösung:

0,6 M Saccharose
0,1% 4-Morpholin-ethansulfonsäure (MES, pH 5,7)
4% Percoll® (Pharmacia, synth. Polysaccharid).

Nach 10minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm flotieren die Protoplasten als Bande und können mit einer 1 ml Eppendorfpipette mit abgeschnittener blauer Spitze abgesammelt werden. Sie wurden einmal mit MES-Puffer gewaschen und die Pellets nach der Zentrifugation in 2 – 4 ml MES-Puffer resuspendiert.

MES-Puffer

0,1% MES (pH 5,7)
15 mM MgCl₂
Mannit ad 600 mosmol.

Die aufbereitete Protoplastensuspension wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Gereinigte Protoplasten erscheinen kugelförmig und sind nahezu frei von kontaminierenden Zellbestandteilen. Die Suspension wurde verworfen, wenn mehr als 10% sichtbar geschädigte

Protoplasten enthalten waren, da dann eine ausreichende Regenerationsrate nicht sichergestellt war. Die hochgereinigten Protoplasten können direkt für die Elektroporation eingesetzt werden.

3. Elektroporation

Alle Experimente wurden mit dem "ELEKTROPORATOR"® (DiaLog) nach einer modifizierten Methode von Shillito et al., Biotechnology 3 (1985) 1099 – 1103 durchgeführt. Das Volumen der zylindrischen Kammer beträgt 1 ml bei einem Elektrodenabstand von 1 cm. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurden für die Transformationsversuche folgende Bedingungen der Elektroporation festgelegt:

- Feldstärke 800 V/cm
- Kapazität 50 nF (vollständige Entladung)
- 3 Pulse im Abstand von je 20 s.

Für die vergleichenden Versuche zwischen der Anwendung freier und nukleosomal organisierter DNA wurde die Gesamtausbeute einer Protoplastenpräparation jeweils im Verhältnis 45 : 45 : 10 aufgeteilt. Je 45% wurden mit freier beziehungsweise nukleosomal organisierter DNA elektroporiert; 10% der Protoplasten wurden als Kontrolle ohne Zusatz von DNA elektroporiert. Die Elektroporationsexperimente wurden nach der im folgenden beschriebenen Methode durchgeführt.

Für die Elektroporation wurden 700 µl der Protoplastensuspension in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 50 µg Kalbsthymus-DNA als Carrier sowie 20 µg linearisiertem Plasmid pLGV 1103 neo beziehungsweise 20 µg nukleosomal organisiertem linearisiertem Plasmid pLGV 1103 neo versetzt. Nach 5 Minuten wurden 350 µl 20% Polyethylenglykol 6000 zugesetzt und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer 5minütigen Inkubation auf Eis. 1010 µl der Suspension wurden luftblasenfrei in die vorgekühlte Kammer überführt und sofort elektroporiert.

Nach der Elektroporation wurden die Proben mit Waschpuffer W 5 (= Lösung W 5, wie oben definiert) aufgefüllt und 3 Minuten bei 1000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend vorsichtig in Gamborg B-5-Medium vorsichtig resuspendiert, dem folgende Hormone zugesetzt waren:

- 0,5 µg/ml 6-Benzylaminopurin (BAP)
- 0,5 µg/ml α -Naphthyl-essigsäure (NAA)
- 0,5 µg/ml 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure (2,4-D).

Um bakteriellen Infektionen vorzubeugen, wurden dem Medium folgende Antibiotika zugesetzt:

- 200 µg/ml Cefotaxim
- 200 µg/ml Carbenicillin.

Die Suspension wurde mit einer Eppendorfpipette in Portionen zu je 2 ml in Petrischalen (\varnothing 6 cm) überführt.

4. Regeneration zu Kalli

Die Protoplasten wurden zunächst in dem geschilderten Medium 6 Tage lang im Dunklen bei 22°C kultiviert. Der Inhalt der Petrischalen wurde täglich leicht bewegt. Nach einer Woche wurde 1 ml Gamborg B-5-Medium (unter Zusatz von 0,5 µg/ml BAP, 0,5 µg/ml NAA, 0,5 µg/ml 2,4-D, jedoch ohne Antibiotika) mit einem os-

motischen Wert von 400 mosmol zugegeben. Gleichzeitig wurde die Verdunklung entfernt. Am 10. Tag nach der Isolation wurde das Medium gegen Gamborg B-5-Medium mit einem osmotischen Wert von 400 mosmol mit den oben beschriebenen Zusätzen getauscht. Am 15. Tag wurde das Medium gegen frisches Gamborg B-5-Medium (unter Zusatz von 0,5 µg/ml BAP, 0,5 µg/ml NAA, 0,5 µg/ml 24-D, jedoch ohne Antibiotika) ausgetauscht. Am 20. Tag hatten die Kalli eine Größe von durchschnittlich 20–50 Zellen erreicht.

5. Selektion auf Kanamycinresistenz

Nachdem in Vorversuchen mit unbehandelten Zellen in keinem Falle eine spontane Toleranz gegen eine Kanamycinkonzentration von 60 µg/ml nachgewiesen werden konnte, wurden alle weiteren Versuche mit Kanamycin als Selektionsmittel ausgeführt.

Zur Selektion wurden die Kalli am 20. Tag nach der Protoplastenisolation in Gamborg B-5-Medium mit 0,8% Agarose, 0,5 µg/ml BAP, 0,5 µg/ml NAA, 0,5 µg/ml 24-D sowie 60 µg/ml Kanamycinsulfat eingebettet. Die Hormone sowie das Kanamycinsulfat (aus einer wäßrigen Stammlösung mit einer Konzentration von 60 mg/ml) wurden bei 50°C zugesetzt. Anschließend wurde das Medium im Wasserbad auf 37°C abgekühlt. Die Kalli wurden in das auf 37°C abgekühlte Medium (je Petrischale 3 ml) eingegossen und möglichst gleichmäßig verteilt. Unter diesen Bedingungen eingegossene Kalli können mit einem inversen Mikroskop ohne Schwierigkeiten beobachtet werden. Am 34. Tag nach der Einbettung in das Selektionsmedium wurden die Kalli zusammen mit der Agarose auf sterile Rundfilter (Ø 80 mm) überführt. Der Inhalt wurde gleichmäßig auf 2 Rundfilter verteilt und mit einem Löffelspatel dünn ausgestrichen. Die Filterpapiere wurden anschließend auf Petrischalen (Ø 95 mm) gelegt, die mit Selektionsmedium (Gamborg B-5-Medium mit den oben beschriebenen Hormonzusätzen sowie 60 µg/ml Kanamycinsulfat) gelegt. Aufgrund der Diffusion wurden die Kalli nun mit den Bestandteilen der frischen Medienschiicht versorgt, so daß ein Mangel an Ionen oder Hormonen sowie Kanamycinsulfat durch Verbrauch oder Zerfall ausgeglichen werden kann.

Zur Beendigung der Selektion auf Kanamycinresistenz wurden die Filterpapiere in neue Petrischalen mit dem gleichen Medium, jedoch ohne Zusatz von Kanamycinsulfat, umgesetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal im Abstand von je zwei Tagen wiederholt. Durch die Diffusion gelangte der größte Teil des Kanamycinsulfats in die untere Medienschiicht und wurde so von den Kalli entfernt, während Ionen und Hormone aus der unteren Schicht nachgeliefert werden können. Die Dauer der Selektion auf kanamycinhaltigem Medium wurde zwischen 18 und 35 Tagen variiert. In Kontrollversuchen mit unbehandeltem Kalli konnte nach 18-tägiger Selektion auf 60 µg/ml in keinem Fall ein überlebender Kallus nachgewiesen werden. Nach der Selektion wurden die überlebenden Kalli zunächst 2–6 Wochen lang auf kanamycinfreiem Medium gehalten, um ein Wachstum bis zu einer Größe von etwa 3–5 mm zu erreichen.

6. Differenzierung und Regeneration zu Pflanzen

Für die Einleitung der Differenzierung wurden die 3–5 mm großen Kalli von den Filterpapieren entfernt und in Petrischalen mit Differenzierungsmedium umgesetzt. Als Differenzierungsmedium wurde Murashige/

Skoog-Medium (Murashige et al., *Physiol. Plant.* (1962) 473–497) mit einem Zusatz von 1,0 µg/ml BAP eingesetzt. Um sicherzustellen, daß die Kalli auch in dieser Phase der Ontogenese das NPT-II-Gen exprimieren, wurde routinemäßig ein Zusatz von 60 µg/ml Kanamycinsulfat beigegeben. Die Kalli wurden bereits zu diesem Zeitpunkt vereinzelt und individuell gekennzeichnet. Unter diesen Bedingungen zeigten die Kalli gutes Wachstum, deutliche Ergrünung sowie Ansätze zur Sproßbildung. Nach 14 Tagen wurden die nun ergrün- ten, teilweise differenzierten Kalli auf Murashige/Skoog-Medium unter Zusatz von 0,1 µg/ml BAP umgesetzt. Auf eine weitere Zugabe von Kanamycinsulfat wurde verzichtet. Innerhalb von 10–20 Tagen differenzierten sich aus jedem Kallus mehrere Sprosse, die teilweise schon Blätter ansetzten oder trugen.

Zur Bewurzelung der Sprosse wurden von diesen etwa 1 cm lange Stücke abgeschnitten und auf frisches hormonfreies Murashige/Skoog-Medium aufgelegt. Dem Medium wurden 60 µg/ml Kanamycinsulfat zugesetzt. Diese zusätzliche Erschwernis sollte verhindern, daß Transformanten, die das NPT-II-Gen nur während bestimmter Stadien ihrer Ontogenese exprimieren, in der Statistik als positive Klone erscheinen. Durch die Kombination dieser stringenten Selektions-Schritte sollte sichergestellt werden, daß weder spontane Mutanten noch Transformanten mit geringer oder nur temporärer Aktivität des NPT-Gens fälschlicherweise als positive Klone in statistische Auswertungen eingehen. Bewurzelte Pflanzen wurden in Kulturgefäße oder Container mit hormonfreiem Murashige/Skoog-Medium umgesetzt und bei 22°C im Kunstlicht kultiviert. Dem Medium wurden grundsätzlich 60 µg/ml Kanamycinsulfat beigegeben, um die Selektionsbedingungen aufrecht zu erhalten.

7. Ergebnisse der vergleichenden Versuche

Zur Auswertung der Effizienz des Verfahrens wurde die maximale Kanamycinkonzentration der einzelnen Transformanten ermittelt, unter welcher diese auf hormonfreiem Medium noch aus Sproßstücken intakte Pflanzen regenerieren können.

Zur experimentellen Durchführung wurden Sproßstücke auf hormonfreies Murashige/Skoog-Medium mit verschiedenen Kanamycinkonzentrationen aufgelegt und geprüft, ob eine Bewurzelung stattfand. Sproßstücke von etwa 1 cm Länge wurden dazu leicht in das Medium hineingedrückt. Von jedem Klon wurden je zwei Kulturen mit den nachfolgenden Kanamycinkonzentrationen angelegt:

- 60 µg < ml Kanamycinsulfat
- 125 µg/ml Kanamycinsulfat
- 250 µg/ml Kanamycinsulfat
- 500 µg/ml Kanamycinsulfat
- 1000 µg/ml Kanamycinsulfat

Während des Versuchs wurden die Pflanzen bei 22°C im Kunstlicht gehalten. Umsetzungen fanden nicht statt. Die Auswertung wurde nach 21 Tagen vorgenommen. Es wurde dabei bewertet, ob die Sproßstücke

- a) Blätter gebildet hatten, die grün und frei von Ausbleichung durch den Einfluß des Kanamycins waren,
- b) deutliche Wurzeln gebildet hatten, die im Medium und nicht nur in der Luft wuchsen, und
- c) die Ergebnisse in den zwei identischen Ansätzen auch identisch waren.

Nur wenn alle drei Bedingungen a) bis c) erfüllt waren, wurde der Klon als resistent gegen die entsprechende Kanamycinkonzentration bezeichnet. Konnte erst nach mehr als 21 Tagen eine Bewurzelung beobachtet werden, so wurden die entsprechenden Klone als nicht-resistent gegen die entsprechende Kanamycinkonzentration bezeichnet, da eine nachlassende Wirkung des Kanamycins nicht auszuschließen war. Die Ergebnisse wurden in Statistiken zusammengefaßt und graphisch präsentiert.

Fig. 1 Resistenz gegen Kanamycinsulfat der Transformanten, die in 5 Versuchsansätzen erhalten wurden, bei denen je 20 µg freier DNA zur Transformation eingesetzt wurden.

Fig. 2 Resistenz gegen Kanamycinsulfat der Transformanten, die in 5 Versuchsansätzen erhalten wurden, bei denen je 20 µg nukleosomal organisierte DNA zur Transformation eingesetzt wurden.

Patentansprüche

1. Verwendung eines DNA-Histon-Komplexes zur Transformation von Pflanzenzellen-Protoplasten.
2. Verfahren zur Expression von Fremdgenen in Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Protoplasten mit DNA-Konstruktionen, die Histone gebunden enthalten, transformiert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Histone pflanzliche Histone sind.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der DNA-Histon-Komplex nukleosomal organisiert ist.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der Elektroporation erfolgt.
6. Kalli, erhalten aus Transformanten, die nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 5 erhalten wurden.
7. Pflanzen, erhalten aus einem Kallus nach Anspruch 6.
8. Vermehrungsgut, erhalten aus einem Kallus nach Anspruch 6 oder aus einer Pflanze nach Anspruch 7.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —

Fig. 1

µg/ml Kanamycinsulfat

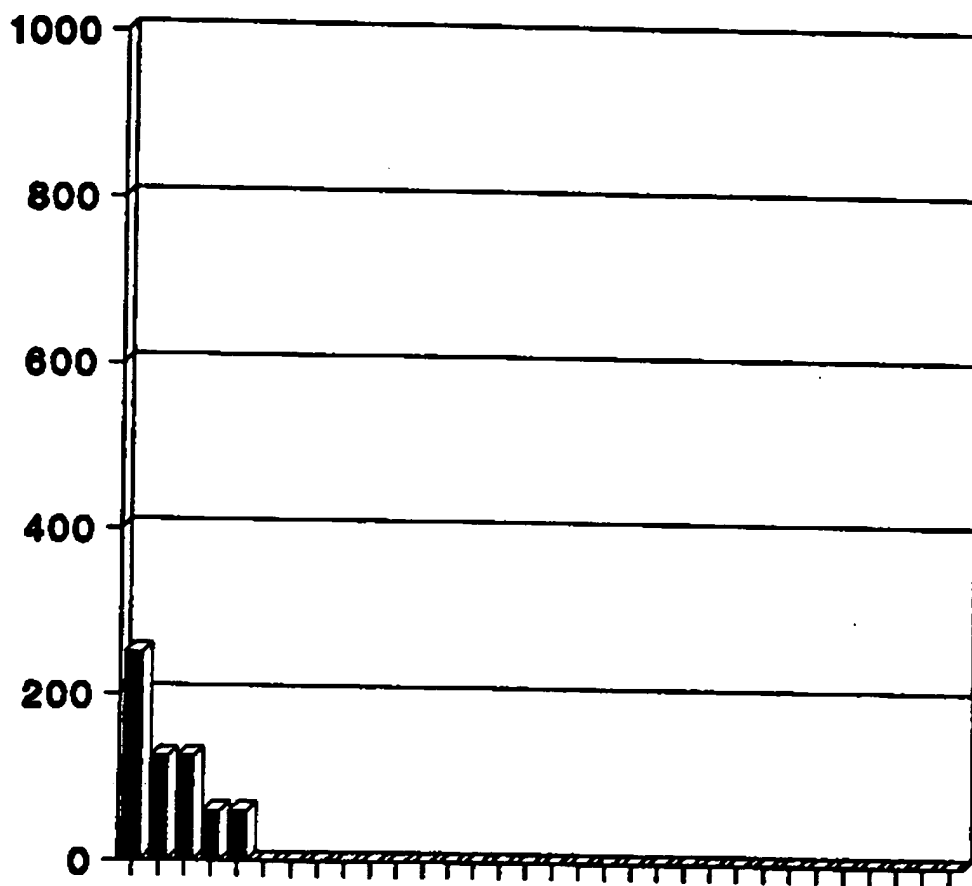


Fig. 2

µg/ml Kanamycinsulfat

